

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 6: G02B		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/06856 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Februar 1999 (11.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04801 (22) Internationales Anmeldedatum: 31. Juli 1998 (31.07.98) (30) Prioritätsdaten: 197 33 193.9 1. August 1997 (01.08.97) DE (71) Anmelder: CARL ZEISS JENA GMBH [DE/DE]; Tatzendpromenade 1a, D-07745 Jena (DE). (72) Erfinder: SIMON, Ulrich; Burgstrasse 35, D-07751 Rothenstein (DE). GLUCH, Martin; Ricarda-Huch-Weg 5, D-07743 Jena (DE). WOLLESCHEFSKY, Ralf; An der Promenade 3, D-99510 Schöten (DE). GRUB, Robert; Lautener Strasse 38, D-73540 Heubach (DE). FAULSTICH, Andreas; Königsberger Strasse 7/1, D-73432 Aalen (DE). VÖLCKER, Martin; Zanger Hauptstrasse 15, D-89551 Königsbrunn (DE). (74) Anwälte: NIESTROY, Manfred; Geyer, Fehners & Partner (Gbr), Sellierstrasse 1, D-07745 Jena (DE) usw.			(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, KR, SG, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>

(54) Title: MICROSCOPE WITH ADAPTIVE OPTICS SYSTEM

(54) Bezeichnung: MIKROSKOP MIT ADAPTIVER OPTIK

(57) Abstract

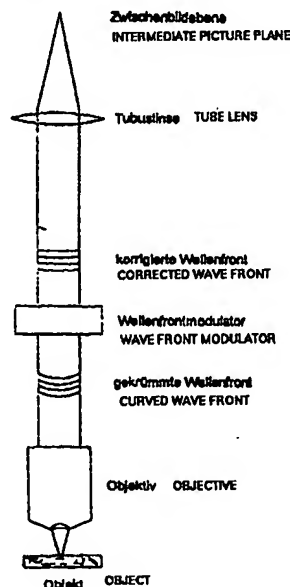
The invention relates to a microscope with an adaptive optics system in the observation beam, whereby a transmitting wave front modulator is positioned advantageously between the objective and the tube lens or a reflective wave front modulator is connected via beam splitters. The invention also relates to a microscope with an adaptive optics system in the illuminating beam. The invention further relates to a laser scanning microscope comprising at least one adaptive optics system positioned downstream from the laser in the optical beam and advantageously a first adaptive optics system for coarse focusing and a second adaptive optics system for fine focusing, whereby the adaptive optics system can be configured as reflective wave front modulator and the laser as short pulse laser. In addition a combination with a pre-chirp unit can be provided for.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Mikroskop mit adaptiver Optik im Beobachtungsstrahlengang, wobei sich vorteilhaft zwischen Objektiv und Tubuslinse ein transmittierender Wellenfrontmodulator befindet oder ein reflektiver Wellenfrontmodulator über Strahlteiler eingekoppelt wird, sowie auf ein Mikroskop mit adaptiver Optik im Beleuchtungsstrahlengang. Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf ein Laser - Scanning - Mikroskop mit mindestens einer dem Laser im Strahlengang nachgeordneten adaptiven Optik vorteilhaft mit einer ersten adaptiven Optik zur Grob- und einer zweiten adaptiven Optik zur Feineinstellung, wobei die adaptive Optik als reflektierender Wellenfrontmodulator und der Laser als Kurzpuls-Laser ausgebildet sein können und weiterhin eine Kombination mit einer Prechirp - Einheit vorgesehen sein kann.

PHASE MODULATOR IN THE OBSERVATION BEAM OF A LIGHT MICROSCOPE:
Phasenmodulator im Beobachtungs-Strahlengang eines Lichtmikroskops:

Anpassung der Fokustiefe im Objekt
ADJUSTMENT OF FOCUSING POSITION IN THE OBJECTIVE



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Titel

Mikroskop mit adaptiver Optik

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf die Erweiterung gängiger Mikroskope um eine adaptive Optik im Beobachtungs- und/oder Beleuchtungsstrahlengang eines Mikroskops. Als adaptive Optik sind hierbei optisch wirksame Baugruppen zur Wellenfrontmodulation zu verstehen. Die adaptive Optik verändert die Phase und/oder die Amplitude des Lichtes gezielt
10 derart, daß sowohl eine Verschiebung und Formung des Fokus im Objektraum, als auch eine Korrektur von eventuellen Aberrationen bewirkt wird. Die möglichen Einsatzgebiete umfassen die konfokale Mikroskopie, die lasergestützte Mikroskopie, die konventionelle Lichtmikroskopie und die analytische Mikroskopie.

15

Stand der Technik

Die vorliegende Erfindung geht von folgenden bisherigen Veröffentlichungen aus:

- 20 – US 4,408,874; W. Zinky, L. Rosenberg; 1981/1983: „Mechanisch oder pneumatisch deformierbares optisches Element zur astigmatischen Vergrößerungseinstellung für Abbildungssystemen in der Lithographie“.
- EPO 0098969 B1; J. Arnaud; 1983/1987: „Deformierbares optisches Element zur astigmatischen Korrektur“. Die Dicke der Spiegelmembran variiert über die Fläche, so daß beim Durchbiegen durch externe Kräfte die Membran eine zuvor berechnete
25 Form annimmt.
- EPO 0307354 B1; H. Choffat; 1988/1992: „Ringanordnung aus bimorphen Piezoschichten zur axialen Feinverstellung von Komponenten, z.B. Mikroskopobjektive“.
- US 5,142,132; B. MacDonald, R. Hunter, A. Smith; 1990/1992: „Adaptiv gesteuertes optisches System zur Waferherstellung (Stepper)“. Das adaptive Element steuert den
30 Fokus und korrigiert Aberrationen. Das Fehlersignal für die Korrektur wird aus dem vom Wafer rückreflektierten Licht durch Interferenz mit dem ursprünglichen Licht gewonnen. Ein genaues Verfahren zur Aberrationskorrektur wird nicht angegeben.
- DP DE 3404063 C2; A. Suzuki, M. Kohno; 1984/1993: „Gekrümmte durchlässige Membran im Strahlengang eines Abbildenden Systems zur Korrektur von Abbildungsfehlern, besonders der lateralen Fokusablage“.
- 35 – US 5,504,575; R. Stafford; 1993/1996: „Spektrometer, basierend auf räumlichem Lichtmodulator und dispersivem Element“. Es werden Fasern und optische Schalter / flexiblen Spiegel verwendet, um das Licht nach Durchgang durch das disperse Element auf den Detektor zu schalten.

- 2 -

- EPO 167877; Bille, Heidelberg Instruments; 1985 angemeldet: „Ophtalmoskop mit adaptivem Spiegel“.

Der Beschreibung der vorliegenden Erfindung liegen folgende Begriffsbestimmungen zugrunde:

- „Wellenfrontmodulator“ im Sinne dieser Erfindung eine Einrichtung zur gezielten Beeinflussung der Phase und/oder der Amplitude einer Lichtwelle. Basierend auf einem reflektierenden optischen Element (deformierbarer Spiegel, elektrostatische Ansteuerung oder durch ein Piezoarray angesteuert oder als bimorpher Spiegel) oder einem transmittierendem optischen Element (LCD oder ähnliche Einheit). Dieses kann kontinuierlich oder segmentiert aufgebaut sein. Insbesondere können die Segmente zur Ansteuerung der jeweiligen Problemstellung angepaßt werden.
- „Aberrationen im Mikroskop“: Die bei einem defokussierten Betriebsmode auftretenden Aberrationen des Mikroskopobjektives lassen sich kategorisieren in prinzipiell korrigierbare und nicht korrigierbare Anteile. Ursächlich können die Aberrationen eingeteilt werden in durch das Objektiv verursachte, durch die weitere Abbildungsoptik des Mikroskops verursachte und letztlich durch das Präparat selbst verursachte Aberrationen.
- „Ansteuerung des Wellenfrontmodulators“: die Ansteuerung des Wellenfrontmodulators erfolgt durch einen Rechner mit Hilfe geeigneter Software. Die erforderlichen Stellgrößen sind entweder zuvor berechnet worden (offline) oder werden aus gemessenen Größen berechnet (online, z.B. durch einen Wellenfrontsensor oder durch Vermessung der Punkthelligkeit im Zwischenbild).

Beschreibung der Erfindung

Sowohl bei der konventionellen Licht- als auch bei der lasergestützten Mikroskopie muß der Fokus des Objektives mit hoher Präzision sowohl entlang der optischen Achse als auch lateral verschoben werden. Bei konventionellen Mikroskopen geschieht dies durch mechanische Verschiebung des Objektisches bzw. des Objektives. Zudem sind im Falle einer Beleuchtung mittels Laserstrahlung Verschiebungen im Objektraum notwendig. Es ergibt sich damit die Notwendigkeit einer dreidimensionalen Fokusführung im Objektraum.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, die axiale Verschiebung des Fokus im Objektraum ohne Veränderung des Abstandes zwischen Objektiv und Objekt zu erreichen.

Erfindungsgemäß ist vorgesehen, diese Verschiebung an der Wellenfront des Strahlenganges vorzunehmen. Dabei entspricht die axiale Verschiebung des Fokus im Objekt einer

- 3 -

sphärischen Veränderung der Wellenfront, die laterale Verschiebung einer Kippung der Wellenfront. Erfindungsgemäß werden auch Aberrationen im Strahlengang durch Veränderung der Wellenfront ausgeglichen. Diese Manipulationen werden in einer *Pupillenebene des Strahlenganges* vorgenommen.

5

Um bei der *konventionellen Lichtmikroskopie im Beobachtungsstrahlengang* eine axiale Verschiebung des Fokus im Objektraum ohne eine Veränderung des Abstandes Objektiv zu Objekt zu erreichen, muß die Wellenfront in der Pupille des Objektivs oder einer zur Pupillenebene äquivalenten Ebene sphärisch verformt werden. Eine solche Verformung

10 kann durch einen Wellenfrontmodulator, nämlich einen Wellenfront-Phasenmodulator, erreicht werden.

15

Fig.1 und Fig.1a zeigen einen schematischen Abbildungsstrahlengang eines Lichtmikroskopes mit einem betrachteten Objekt, einem Objektiv und einer Tubuslinse zur Erzeugung eines Zwischenbildes, das mit Okularen (nicht dargestellt) betrachtet werden kann. Zwischen Tubuslinse und Objektiv ist erfindungsgemäß ein Wellenfrontmodulator angeordnet. Die nach dem Objektiv gekrümmte Wellenfront wird durch den Wellenfrontmodulator korrigiert, indem die Aberrationen des Objektivs ausgeglichen werden.

20

Berechnungen haben gezeigt, daß bei Krümmungsradien der Wellenfront in der Pupille zwischen -3,0m und 1,5m der Fokus um mehr als 1,5mm verschoben werden kann. Dies ist abhängig vom verwendeten Objektiv; im angegebenen Fall beziehen sich die Angaben auf das Epiplan-Neofluar 20x/0.5. Verschiebungen im Bereich einiger zehn Mikrometer reichen in den meisten Fällen bereits aus. Wie die mathematischen Rechnungen weiter

25 gezeigt haben wird das Intervall einer möglichen Fokusverschiebung mit steigender Vergrößerung des Objektivs geringer. Da das Objektiv jedoch nicht für diese sphärisch verformte Wellenfront in der Eintrittspupille berechnet und konstruiert ist, sind Aberrationen durch das Objektiv bei der Defokussierung nicht zu vermeiden.

30

Eine solche Fokusverschiebung ohne mechanische Beeinflussung des Objektivs hat mehrere Vorteile. Zum einen wird durch den festen Arbeitsabstand von Objektivfrontlinse zum Objekt jegliche mechanische Beeinflussung des Objektes durch das Mikroskopobjektiv eliminiert. Es wird damit z.B. erst möglich am statischen, wasserimmernierten Objekt schnittweise Bildaufnahmen mit unterschiedlicher Tiefenlage der Beobachtungsebene

35 durchzuführen. Eine solche Technik scheiterte bisher an der mechanischen Verformung des Objektes und seiner Umgebung durch mechanischen Druck auf das Präparat.

Durch den festen Arbeitsabstand am Mikroskop ergeben sich auch Vorteile bei der analytischen Untersuchung von Proben im biomedizinischen Bereich. Bei der Verwendung von

- 4 -

Mikrotiterplatten kann eine Korrektur von Aberrationen, die von der Mikrotiterplatte herühren, ausgeglichen werden. Die Mikrotiterplatte kann optisch in den Strahlengang einbezogen und das Mikroskopobjektiv teilweise (so z.B. die Frontlinse) in die Mikrotiterplatte integriert werden.

5

Fig.1b zeigt beispielhaft eine Ausführung eines Lichtmikroskopes mit deformierbaren Spiegeln, die die Wellenfront in Richtung der Tubuslinse korrigieren. Eine erste und eine zweite Modulatoranordnung werden über einen Strahlteiler zwischen Objektiv und Tubuslinse in die Abbildung einbezogen. Vor den Modulatoranordnungen sind jeweils noch Optiken zur Pupillenanpassung vorgesehen. Auf derartige Anordnungen wird noch in Verbindung mit Fig.7 näher eingegangen.

10

Durch eine geeignete Verformung der Wellenfront durch den Wellenfrontmodulator ist auch eine Korrektur von Aberrationen durch das Präparat und die Probenumgebung möglich. Dies ist in Fig.2 dargestellt. Hier wird die durch Abberationen verzerrte Wellenfront durch den zwischen Objektiv und Tubuslinse angeordneten Wellenfrontmodulator korrigiert. Dazu reichen jedoch die sphärischen Anteile in der Wellenfrontkorrektur nicht aus, es müssen asphärische Anteile hinzugenommen werden. Für die rotationssymmetrischen Aberrationen (alle Terme der sphärischen Aberration höherer Ordnung) reichen ringförmige Aktuatoren aus. Für die winkelabhängigen Aberrationen müssen segmentierte Aktuatoren verwendet werden

15

20

(Fig.4). Diese können entweder miteinander im selben Wellenfrontmodulator integriert werden, oder man setzt zwei unabhängige Modulatoren in verschiedenen Pupillenebenen ein. Im ersten Fall skaliert die Anzahl der Aktuatoren quadratisch mit der geforderten Auflösung, im letzteren linear, was geringeren Aufwand an Ansteuerelektronik bedeutet.

25

Die derzeit gängigen Phasenmodulatoren sind in ihrer Amplitude und ihrem maximal erzeugbaren Phasengradienten begrenzt. Dies begrenzt wiederum die Korrekturmöglichkeiten weitab vom Arbeitspunkt des Objektives. Denkbarer Ausweg ist die Kombination von adaptiver Optik mit konventioneller Glasoptik. Letztere dient dabei zur Erzeugung eines großen Phasengradienten bzw. großer Wellenfront-Amplituden, die Feinabstimmung wird durch die adaptive Optik erreicht.

30

Bei einer Verschiebung zu größerem Fokusabstand tritt, bedingt durch die erforderliche konvexe Wellenfront in der Pupille, eine Vignettierung ein, die zu einer geringeren Lichtausbeute bzw. einer verringerten nutzbaren Apertur führt. Diese Einschränkung ist konstruktionsbedingt und kann im Prinzip zukünftig bei der optischen Auslegung eines Objektivs berücksichtigt werden.

35

- 5 -

Bei der Verschiebung des Fokus entstehen darüber hinaus Aberrationen im Strahlengang, die zu Verzerrungen des Bildes führen können. Zur Korrektur dieser Aberrationen können der Wellenfront wie oben angedeutet nicht-sphärische Anteile überlagert werden. Nach mathematischen Berechnungen kann bereits mit geringen rotationssymmetrischen Anteilen der Ordnung r^4 und r^6 (sphärische Aberration höherer Ordnung) an der Wellenfront eine erhebliche Bildverbesserung erreicht werden (Strehlverhältnis >98%).

Ein weiterer Vorteil des Verfahrens liegt im achromatischen Verhalten eines reflektionsbasierten Wellenfrontmodulators. Bei geeigneter Beschichtung des Membranspiegels kann der gesamte Spektralbereich vom tiefen UV bis hin zum fernen IR phasenmoduliert werden. Chromatische Aberrationen sind (bis auf Absorptionseffekte) ausgeschlossen. Daraus ergeben sich neue Verfahren der chromatischen Korrektur in der Bilderzeugung. Die Beleuchtung wird dazu sequentiell auf unterschiedliche Wellenlängen eingestellt, wobei für jede der individuellen Wellenlängen der Wellenfrontmodulator auf die geeignete optische Korrektur eingestellt wird. Man erhält so einen Satz von chromatisch optimal korrigierten Bildern, die überlagert eine Weißlichtaufnahme hoher Farbkorrektur ergeben, welche bei Verwendung klassischer Glasoptik so nicht erreicht werden kann. Prinzipiell kann damit ein Objektiv mit Wellenfrontmodulator auf beliebig viele Wellenlängen im optischen Spektrum optimal korrigiert werden.

Zur Verschiebung des Fokus und zur Korrektur von sphärischen Aberrationen haben die erforderlichen Wellenfronten zunächst lediglich rotationssymmetrischen Charakter. Zur Erzeugung solcher Wellenfronten in der Pupille des Mikroskopobjektivs muß die adaptive Optik eine Verteilung der Aktuatoren mit zum Rand hin zunehmender Ortsfrequenz aufweisen (Fig.4), da am Rand der größte Gradient in der Wellenfront auftritt.

Fig.4 zeigt verschiedene Aktuatorstrukturen, mit zunehmender Ortsfrequenz in Fig.4a bis Fig.4c sowie mit Segmenten in Fig.4d zur Korrektur beispielsweise von Astigmatismus und Koma.

Bei einer kameragestützten Bildaufnahme tritt besonders bei hoher räumlicher Auflösung der Effekt des Pixelmismatchings auf. Dabei ist das Mikroskopbild gegen die Kamera verschoben, so daß die einzelnen Bilder des Videosignals räumlich verschoben sind. Dieses Problem läßt sich durch einen variablen Kippanteil in der Wellenfront des abzubildenden Signals beseitigen. Durch eine geeignete Regelung können die Zitterbewegungen des Bildsignals ausgeregelt und somit ein statisches Bild erzeugt werden.

Ein anderes Problem der kameragestützten Bildaufnahme ist die Bildfeldwölbung. Durch die Verwendung eines Wellenfrontmodulators im Abbildungsstrahlengang kann während

des Betriebes die Bildfeldwölbung auf Kosten anderer Parameter wie chromatische Korrektur verbessert werden.

Im *Beleuchtungsstrahlengang* lassen sich bei der *konventionellen Lichtmikroskopie* durch den Einbau adaptiver Optik eine flexible Auslegung der Optik, Verbesserung der optischen Eigenschaften des Mikroskops sowie neue Beleuchtungstechniken realisieren. In ähnlicher Weise wie im Beobachtungsstrahlengang kann ein Wellenfront-Phasenmodulator die Abbildung des Beleuchtungsbrenners (oder ggf. des Lasers) in die Objektebene optimieren. Ebenso kann bei kritischer Beleuchtung eine gleichmäßige Ausleuchtung des Objektraumes eingestellt werden. Fig.3 zeigt einen Wellenfrontmodulator zwischen Kollektor und Kondensor, die einem Beleuchtungsbrenner nachgeordnet sind.

Mit einem Wellenfront-Amplitudenmodulator kann die Beleuchtungsintensität in der Objektebene räumlich bezüglich Intensität und Homogenität optimiert werden. Prinzipiell ist so ein Pupilleneingriff machbar. Durch gezielte Veränderung des Kippanteiles der Wellenfront kann eine schiefe Beleuchtung des Objektraumes erreicht werden.

In der *konfokalen Mikroskopie* bzw. im *Laser-Scan-Mikroskop* sind durch die Verwendung von Laserlicht zur Beleuchtung die Anwendungen noch leichter realisierbar als in der klassischen Lichtmikroskopie.

So bietet bei der Verwendung eines Lasers in der Beleuchtung der Einsatz eines Wellenfrontmodulators bereits bei der Einkopplung in die Beleuchtungsfaser Vorteile. Hier sind variable Anpassungsoptiken realisierbar, deren Brennweiten und Abbildungsverhältnis abhängig von den Strahleigenschaften der (des) Laser(s) und der verwendeten Faser(n) einstellbar ist, um eine optimale Fasereinkopplung zu erreichen. Anordnungen auf demselben Prinzip können auch bei der Kopplung von Beleuchtungsfasern auf die Mikroskopoptik eingesetzt werden. Durch die Schnelligkeit der Modulatoren sind auch zeitaufgelöste Messungen und Multiplexverfahren realisierbar, um zwischen einem oder mehreren Lasern und verschiedenen Fasern umzuschalten.

Bei der konfokalen Abbildung kann die Transmission durch das definierende Pinhole dynamisch angepaßt werden. Sowohl Lage als auch Durchmesser des Fokus ist in weiten Grenzen variabel. Der oder die Beleuchtungslaser können so optimal gemäß der jeweiligen Anforderungen justiert werden. Weiter kann auch die Kontur der Lichtverteilung des Fokus dem Pinhole angepaßt werden. Nicht nur rotationssymmetrische, sondern auch andere Umrisse, wie rautenförmige oder rechteckige Aperturen, die in real verwirklichten Pinholes immer vorkommen, können damit angepaßt und auf maximale Transmission oder minimale Beugungsverluste optimiert werden. Eine solche Optimierung kann einerseits sta-

- 7 -

tisch durch zuvor berechnete Parameter eingestellt werden oder während des Betriebs auf bestimmte, zu optimierende Parameter geregelt werden.

Wie bei der klassischen Lichtmikroskopie auch läßt sich die chromatische Korrektur abhängig vom verwendeten Beleuchtungslaser einstellen. Durch die Verwendung schneller, synchron angesteuerter Wellenfrontmodulatoren in der Lasereinkopplung, der Beleuchtungs- sowie der Aufnahmeoptik können sequentiell Bilder bei unterschiedlicher Wellenlänge, jeweils optimal chromatisch korrigiert, aufgenommen werden.

10

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden. Die zugehörigen Zeichnungen zeigen in

- | | |
|------------------|---|
| Fig.1 und Fig.1a | den schematischen Abbildungsstrahlengang eines Lichtmikroskopes |
| Fig.2 | die Korrektur einer durch Abberationen verzerrte Wellenfront mit einem zwischen Objektiv und Tubuslinse angeordneten Wellenfrontmodulator |
| Fig.3 | einen zwischen Kollektor und Kondensor angeordneten Wellenfrontmodulator zur Einstellung einer gleichmäßigen Ausleuchtung des Objektraumes |
| Fig.4 | verschiedene Aktuatorstrukturen, darunter in Fig.4a bis Fig.4c mit zunehmender Ortsfrequenz und in Fig.4d mit Segmenten |
| Fig.5 | verschiedene Ausführungen von Wellenfrontmodulatoren, darunter mit elektrostatischen (Fig.5a), piezogesteuerten (Fig.5b) und bimorphen Membranen (Fig.5c) als Stellelemente |
| Fig.6 | Wellenfrontmodulator mit elektrostatischem Membranspiegel |
| Fig.7 | das Prinzip eines Laser-Scanning-Mikroskops mit einem Kurzpuls-Laser |
| Fig.8 | den prinzipiellen Aufbau einer Prechirp-Einheit |

15

Ausführliche Beschreibung der Zeichnungen

In Fig.5 sind verschiedene Ausführungen von Wellenfrontmodulatoren dargestellt, wie sie derzeit erhältlich sind. So sind etwa transmittierende Modulatoren auf LCD-Basis, wie in Fig.5d dargestellt, verfügbar oder auch reflektierende Modulatoren mit beweglichen Membranen. Letztere wiederum können nach der Art ihrer Stellelemente unterschieden werden: elektrostatische (Fig.5a), piezogesteuerte (Fig.5b) und bimorphe Membranen (Fig.5c) als Stellelemente. Obwohl sich die Erfindung auf Wellenfrontmodulatoren allgemein bezieht, hat der elektrostatische Membranspiegel wegen seiner zahlreichen Vorteile den Vorzug.

25

Ein solcher mikrofabrizierter monolithischer Membranspiegel, der in Fig.6a und Fig.6b deutlicher mit Membran M und Ansteuerelektroden E dargestellt ist, zeichnet sich durch hohe Ebenheit und gute optische Qualität der reflektierenden Fläche ($< \lambda/20$), geringe Baugröße (2mm bis 20mm), hysteresefreie Ansteuerung mit niedrigen Spannungen ($< 100V$), hohe mechanische Grenzfrequenz der Membran (mehrere MHz), großer Hub ($\approx 100\mu m$) und damit kleiner Krümmungsradius (bis herunter zu 1m) und in weiten Grenzen variabler Aktuatorstruktur mit hoher räumlicher Dichte aus. Die minimale Aktuatorgröße ist letztlich nur durch die Bedingung begrenzt, daß diese größer sein muß als der Abstand Elektrode zu Membran.

Der große Vorteil des elektrostatischen Membranspiegels liegt in der Tatsache, daß zur Einstellung einer parabolischen Form lediglich ein konstantes Potential an die Aktuatorelektroden angelegt werden muß. Die parabolische Form des Spiegels ergibt sich bei konstanter Ansteuerung der Elektroden aus dem physikalischen Verhalten der Membran (konstante Flächenkraft). Man kann also mit geringer Dynamik in der Steuergröße, also der angelegten Spannung, eine große Dynamik in der Stellgröße (Spiegelhub) erreichen.

Fig.7 zeigt ein Laser-Scanning-Mikroskop mit einem Kurzpulslaser, insbesondere zur Mehrphotonenanregung, das im folgenden näher erläutert wird.

Im Falle *nichtlinearer Prozesse* hängt das detektierte Signal von der n-ten Potenz der Anregungsintensität ab. Zur Anregung sind hohe Intensitäten nötig. Diese hohen Intensitäten erzielt man durch den Einsatz von Kurzpulslasern und die anschließende beugungsbegrenzte Fokussierung mit Mikroskopobjektiven. Ziel der Anordnung ist es deshalb den Fokus möglichst klein (d.h. ideal) und die Pulslänge möglichst kurz in der Probe zu realisieren. Somit können hohe Intensitäten in der Probe erzielt werden. Nichtlineare Prozesse sind zum Beispiel die Multi-Photonen-Absorption, Generierung der Oberflächen Zweiten Harmonischen (SSHG) sowie der Zweiten Harmonischen (SHG), zeitaufgelöste Mikroskopie, OBIC, LIVA usw.

Die Erfindung nun anhand der *Zwei-Photonen Mikroskopie* näher erläutert werden. Dabei wird von folgendem Stand der Technik ausgegangen:

Aus WO 91/07651 ist ein Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop bekannt, mit Anregung durch Laserpulse im Subpicosekundenbereich bei Anregungswellenlängen im roten oder infraroten Bereich. Die Veröffentlichungen EP 666473A1, WO 95/30166, DE 4414940 A1 beschreiben Anregungen im Picosekundenbereich und darüber, mit gepulster oder

kontinuierlicher Laserstrahlung. Ein Verfahren zum optischen Anregen einer Probe mittels einer Zwei-Photonen-Anregung ist in DE C2 4331570 beschrieben.

Das Gebrauchsmuster DE 29609850 beschreibt die Einkopplung der Strahlung von Kurzpulslasern in einen mikroskopischen Strahlengang über Lichtleitfasern. Hier ist zwischen Laser und Lichtleitfaser eine optische Anordnung zur wellenlängenabhängigen zeitlichen Veränderung der Laserpulse vorgesehen, die aus mindestens zwei optischen Elementen, beispielhaft Prismen oder Spiegeln, besteht. Mit dieser optischen Anordnung ist der zeitliche Unterschied verschiedener Wellenlängen der Laserpulse einstellbar, indem der Abstand zwischen den optischen Elementen verändert wird.

Bekanntermaßen eröffnet die Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie gegenüber der konventionellen Ein-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie grundsätzlich folgende Möglichkeiten:

- Realisierung einer nichtlinearen Anregungswahrscheinlichkeit $I_{2h\nu} = A \cdot I_{exc}^2$ mit folgenden Vorteilen: 3D-Diskriminierung, d.h. Tiefendiskriminierung ohne Verwendung einer konfokalen Blende; Ausbleichen bzw. Zerstörung der Zellen findet - wenn überhaupt - nur im Fokus statt; Verbessertes Signal- / Rauschverhältnis; Einsatz neuer Detektionsmethoden, wie z.B. non-descanned detection;
- Die NIR-Anregung mit Femtosekunden-Lasern besitzt für die Untersuchung von biologischen Präparaten nachstehende Vorzüge: Arbeiten im Bereich des optischen Fensters für biologische Präparate (700-1400 nm) wegen geringer Absorption, deshalb auch zur Untersuchung von Lebendpräparaten geeignet; niedrige Belastung der Zellen wegen geringer mittlerer Anregungsleistung; hohe Eindringtiefen infolge geringer Streuung;
- Die Anregung von sogenannten UV-Farbstoffen ohne Verwendung von UV-Licht bedeutet, daß keine UV-Optiken nötig sind;
- Bei der Zwei-Photonen-Anregung liegen breitbandige Anregungsspektren der Farbstoffe vor, daher ist die Anregung verschiedenster Farbstoffe mit nur einer Anregungswellenlänge möglich.

Beim Durchgang ultrakurzer Pulse durch ein dispersives Medium, z.B. Glas oder Präparat treten insbesondere folgende Effekte auf:

Group Velocity Dispersion (GVD): Femtosekunden-Laserimpulse besitzen eine spektrale Breite von mehreren Nanometern. Die rot verschobenen Wellenlängenanteile propagieren schneller durch ein positiv dispersives Medium (z.B. Glas) als die blau verschobenen Wellenlängenanteile. Dadurch kommt es zu einer zeitliche Verbreiterung der Pulse und damit zu einer Verringerung der Peakleistung bzw. des Fluoreszenzsignales.

Eine Prechirp-Einheit (Prismen-, Gitterpaar oder Kombination aus beiden) stellt ein negativ dispersives Medium dar, das heißt blau verschobene Wellenlängenanteile propagieren schneller als rot verschobene. Mit Hilfe einer Prechirp-Einheit kann somit die Group Velocity Dispersion kompensiert werden.

Propagation Time Difference (PTD): Die Glaswege entlang des Strahlquerschnittes sind unterschiedlich (siehe Fig4). Dadurch kommt es zu einer räumlichen Vergrößerung des Fokus, wodurch eine Verringerung des Auflösungsvermögens und der Peakleistung bzw. des Fluoreszenzsignales eintritt.

Die Kompensation dieses Effektes kann mit Hilfe eines Wellenfrontmodulators, beispielsweise einem adaptiven Spiegel, erfolgen. Mit einem Modulator dieser Art kann die Phase und die Amplitude der Lichtwelle im Anregungsstrahlengang gezielt beeinflusst werden. Als Modulator ist ein reflektierendes optisches Element (z.B. deformierbarer Spiegel) oder ein transmittierendes optisches Element (z.B. LCD) denkbar.

Wellenfrontdistorsion durch Streuung und Diffraction/ Refraktion: Diese Störungen können zum einen durch die verwendeten Optiken selbst und zum anderen durch das Präparat verursacht werden. Durch die Wellenfrontdistorsion kommt es wie beim zweiten Effekt ebenfalls zu Abweichungen vom idealen Fokus. Auch dieser Effekt kann mit einem Wellenfrontmodulator (wie bereits dargestellt) kompensiert werden.

Die vorgenannten Effekte sind in der Regel abhängig von der Eindringtiefe in das Präparat. Insofern werden mit der erfindungsgemäßen Anordnung die Effekte GVD, PTD und Wellenfrontdistorsion synchron als Funktion der Eindringtiefe in das Präparat kompensiert, um im Fokus des Präparats, auch bei hohen Eindringtiefen, kurze Pulslängen und einen möglichst ideal kleinen Fokus erzielen zu können.

Ein möglicher Aufbau der Vorrichtung ist beispielhaft in Fig7 gezeigt. Die Strahlung eines Kurzpulslasers KPL gelangt in eine Prechirping-Einheit PCU und von dieser über Strahlteiler ST1 und Strahlteiler ST2, ST3 auf zwei adaptive optische Elemente AD1, AD2. Das erste Element AD1 (course) wird für die Grobeinstellung der Wellenfront genutzt. Damit ist es möglich den Fokus in z-Richtung zu verschieben. Mit dem zweiten Element AD2 (fine) werden die Wellenfrontdistorsionen und die PTD-Effekte ausgeglichen. Das Laserlicht gelangt über Strahlteiler DBS, x/y - Scaneinheit, Optik SL, TL, Spiegel SP und das Objektiv OL auf das Objekt. Das vom Objekt kommende Licht gelangt zurück über Strahlteiler DBS, Linse L, Pinhole PH und Filter EF auf einen Detektor, hier beispielsweise ein Photomultiplier PMT, der seinerseits wie auch PCU, AD1, und AD2 mit einer Controleinheit verbunden ist.

Hierdurch kann beispielsweise die Einstellung der adaptiven Elemente AD1, AD2 sowie der Prechirping - Einheit erfolgen, bis am PMT ein maximales Signal anliegt. Besonders vorteilhaft ist der dargestellte Strahlengang für ein inverses Mikroskop, bei dem die Beobachtung „von unten“ erfolgt, wobei der Vorteil darin besteht, daß die Probe für eventuelle Manipulationen im vollen Umfang zugänglich bleibt.

Fig.6 zeigte bereits den prinzipiellen Aufbau eines adaptiven Spiegels. Er besteht aus einer hochreflektierenden Membran (z.B. Siliziumnitrat) und aus einer Struktur mit Elektroden. Durch eine gezielte Ansteuerung der einzelnen Elektroden kann die darüberliegende Membran deformiert werden und so die Phasenfront des Laserstrahles beeinflusst werden. Es können somit die Deformationen des Phasenfront, die beim Durchgang der Pulse durch das System und die Probe entstehen, kompensiert werden.

Die Prechirp-Einheit kann aus einem oder mehreren Prismen oder Gittern oder aus einer Kombination beider bestehen. Hierzu zeigt Fig.8 mögliche Anordnungen, so in Fig.8a mit vier Prismen, in Fig.8b mit vier Gittern und in Fig.8c mit Prismen und Gittern. Die Funktionsweise soll anhand eines Prismenkompressors in Fig.8a näher erläutert werden. Die spektrale Breite eines Femtosekunden-Laserpulses beträgt mehrere Nanometer. Beim Durchgang des Laserstrahles durch das erste Prisma wird der Strahl spektral in seine Komponenten zerlegt. Anschließend durchlaufen die spektralen Komponenten im zweiten Prisma unterschiedliche Glaswege. Dadurch werden rotverschobene Wellenlängenanteile gegenüber den blauverschobenen zeitlich verzögert. Die Prechirp-Einheit wirkt somit wie ein negativ dispersives Medium und eine Kompensation der GVD ist mit möglich.

Erst durch die Verwendung der oben beschriebenen Vorrichtung können die Vorteile der Anregung nichtlinearer Prozesse vollständig genutzt werden und eine Verwendung von Low-Power Femtosekunden-Lasern auch bei höheren Eindringtiefen in die Probe wird möglich. Es können somit hohe Peakleistungen bei Verwendung von geringen mittleren Anregungsleistungen technisch realisiert werden, so daß die Belastung der biologischen Präparate bzw. der Proben gering gehalten, ein hohes Signal-/ Rauschverhältnis und eine hohe Auflösung in axialer und lateraler Richtung erzielt werden.

Für alle beschriebenen Anordnungen kann vorteilhaft über einen Wellenfrontsensor, der über einen Strahlteiler (nicht dargestellt) mit dem Mikroskopstrahlengang in Verbindung steht, die Wellenfrontanpassung erfaßt und kontrolliert bzw. definiert eingestellt werden.

Ansprüche

1. Mikroskop, bei dem im Beleuchtungsstrahlengang und/oder im Beobachtungsstrahlengang eine adaptive Optik vorgesehen ist.
5
2. Mikroskop nach Anspruch 1, bei dem sich im Beobachtungsstrahlengang zwischen Objektiv und Tubuslinse ein transmittierender Wellenfrontmodulator befindet.
3. Mikroskop nach Anspruch 2, bei dem im Beobachtungsstrahlengang zwischen Ob-
10 jektiv und Tubuslinse mindestens ein reflektiver Wellenfrontmodulator angeordnet ist.
4. Mikroskop nach Anspruch 3, wobei die Einkopplung des reflektiven Wellenfrontmo-
15 dulators bzw. der reflektiven Wellenfrontmodulatoren über Strahlteiler vorgesehen ist.
5. Mikroskop nach Anspruch 1, bei dem sich im Beleuchtungsstrahlengang zwischen Lichtquelle und Kondensor ein Wellenfrontmodulator befindet.
- 20 6. Mikroskop nach Anspruch 5, bei dem ein transmittierender Wellenfrontmodulator vorgesehen ist.
7. Laser - Scanning - Mikroskop, bei dem der Laserstrahlungsquelle mindestens eine
25 adaptive Optik nachgeordnet ist.
8. Laser - Scanning - Mikroskop nach Anspruch 7, mit einer ersten adaptiven Optik zur Grobeinstellung und einer zweiten adaptiven Optik zur Feineinstellung der Wellenfront.
- 30 9. Laser - Scanning - Mikroskop nach einem der Ansprüche 7 oder 8, bei dem die adaptive Optik als reflektierender Wellenfrontmodulator ausgebildet ist.
10. Laser - Scanning - Mikroskop nach einem der Ansprüche 7 bis 9 mit einem Kurzpuls-
35 pulslaser als Laserstrahlungsquelle.
11. Laser - Scanning - Mikroskop nach einem der Ansprüche 7 bis 10, bei dem der Laserstrahlungsquelle eine Prechirping - Einheit zur Kompensation der Group Velocity Dispersion (GVD) nachgeordnet ist.

12. Laser - Scanning - Mikroskop zur Mehrphotonenanregung mit Kurzpulslaser nach Anspruch 10, bei dem der Laserstrahlungsquelle eine Prechirping - Einheit sowie mindestens eine adaptive Optik nachgeordnet sind.

Phasenmodulator im Beobachtungs-Strahlengang
eines Lichtmikroskops:

Anpassung der Fokustlage im Objekt

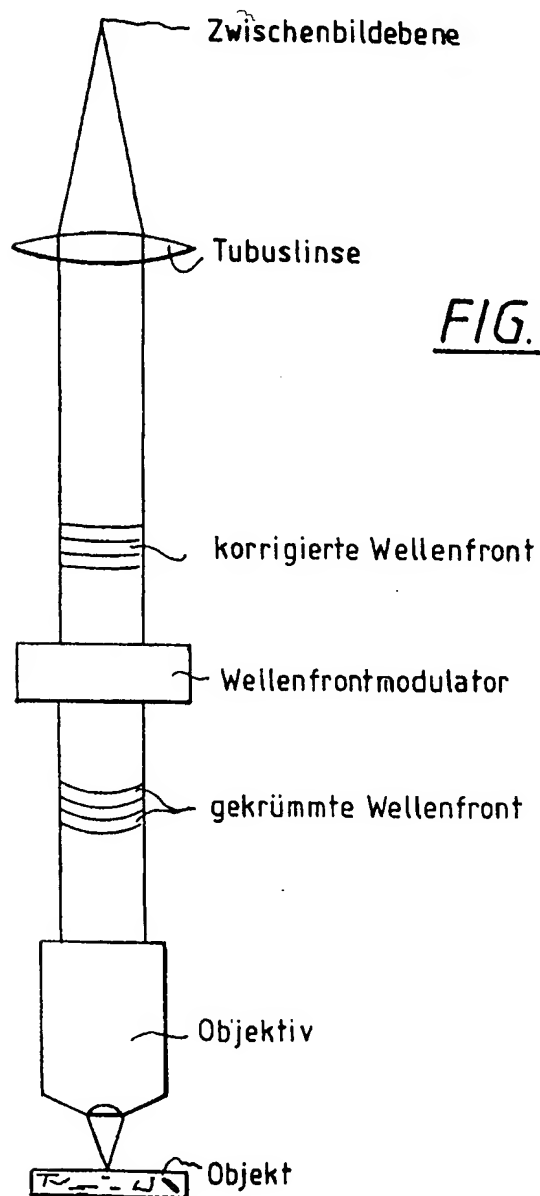
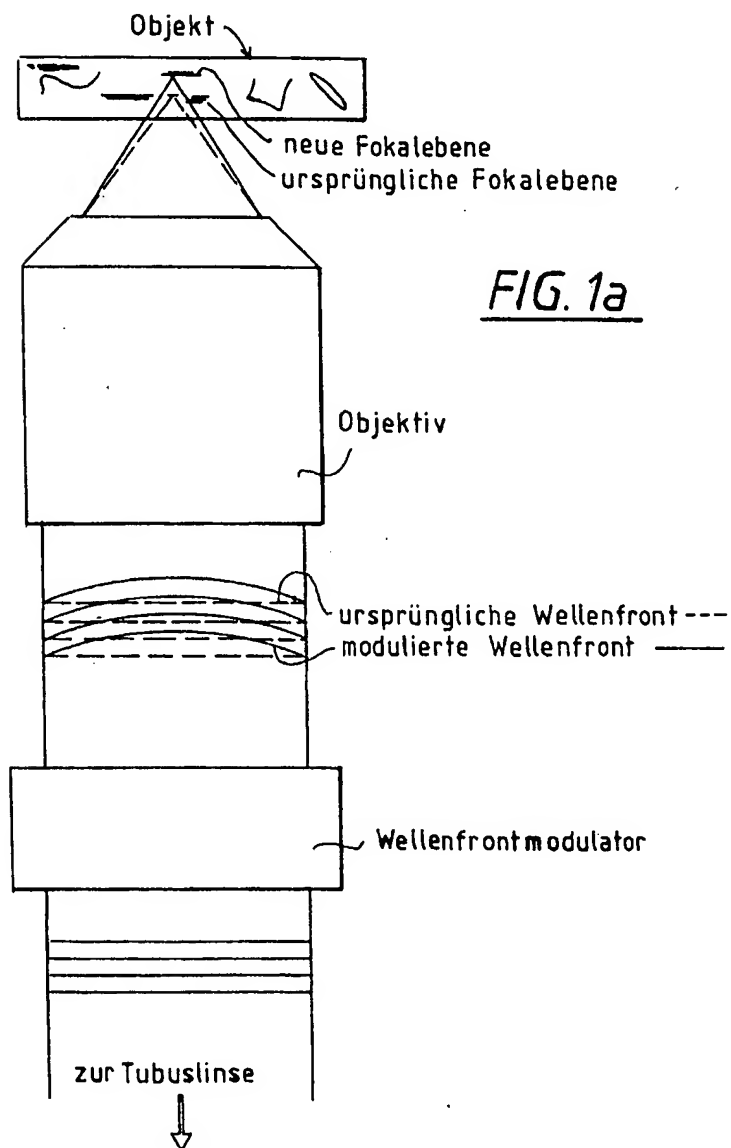


FIG. 1

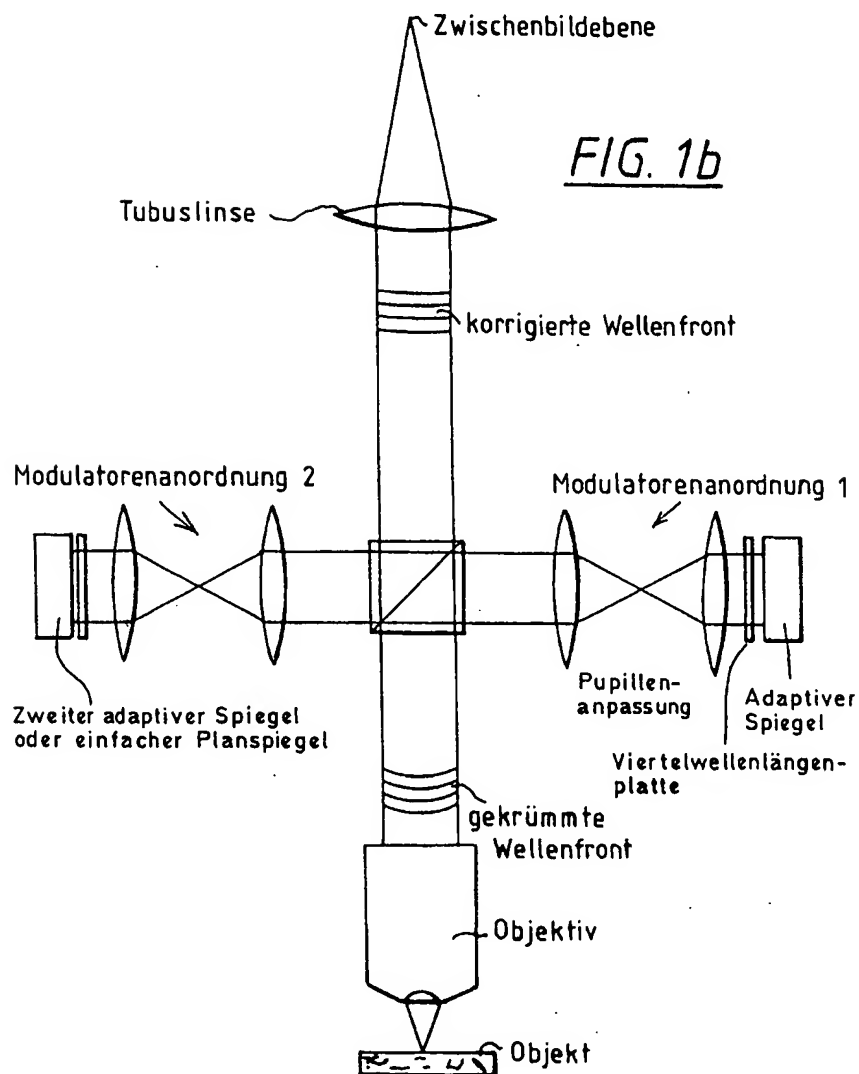
Phasenmodulator im Beobachtungs-Strahlengang
eines Lichtmikroskops:
Variation der Fokallage



Phasenmodulator im Beobachtungs-Strahlengang
eines Lichtmikroskops:

Anpassung der Fokuslage im Objekt

Ausführung mit deformierbaren Spiegel(n)



Phasenmodulator im Beobachtungs-Strahlengang
eines Lichtmikroskops:

Korrektur von Aberration

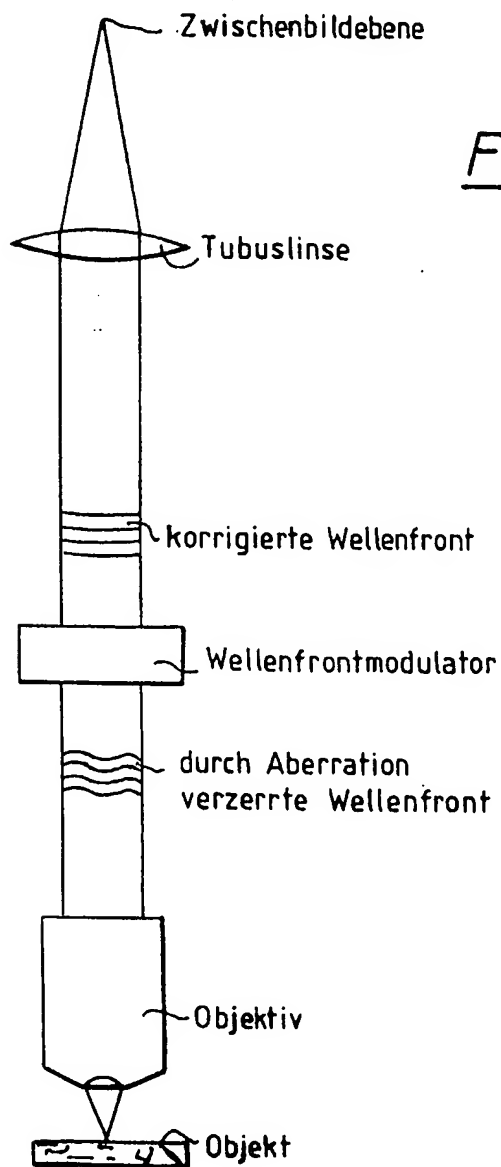
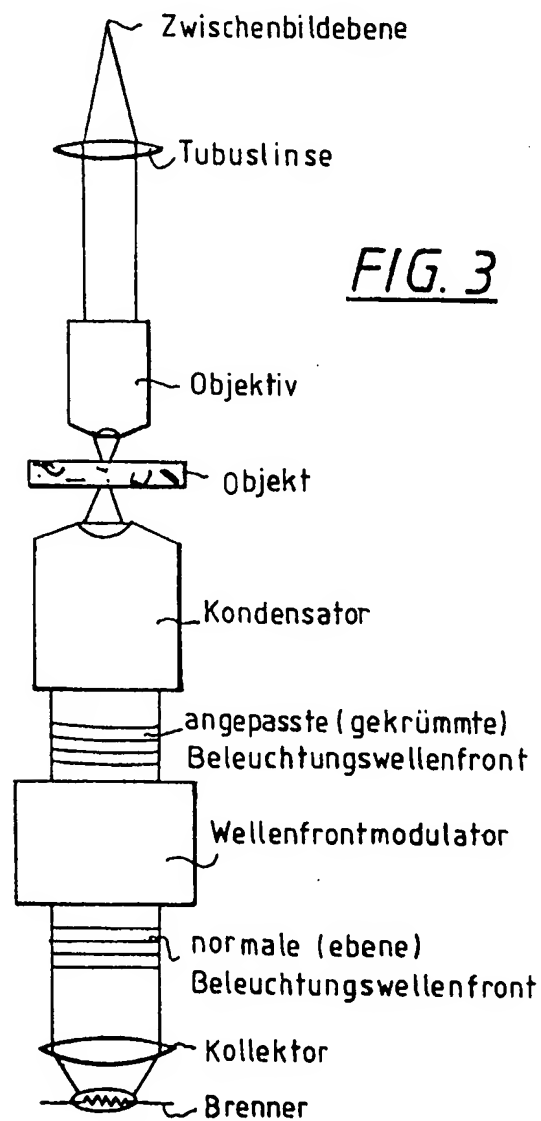


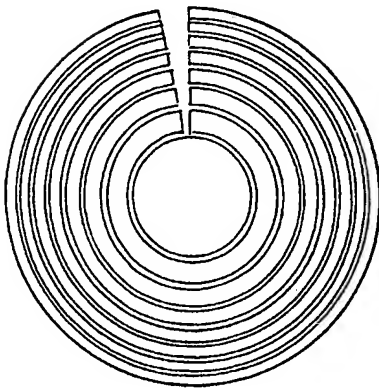
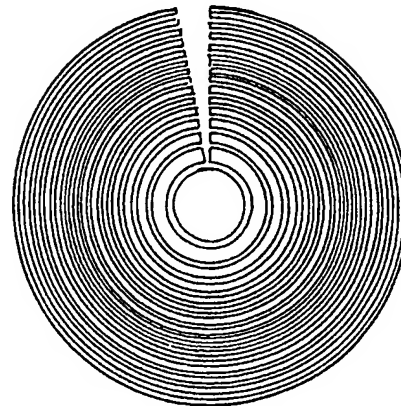
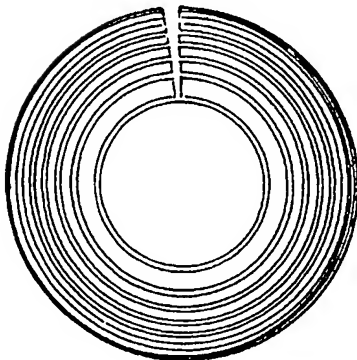
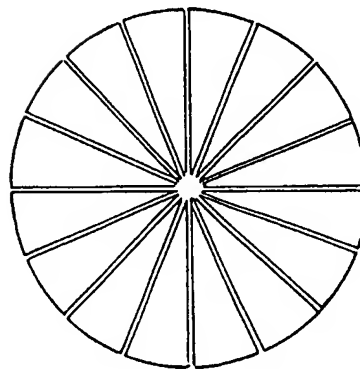
FIG. 2

Phasenmodulator im Beleuchtungs-Strahlengang eines Lichtmikroskops

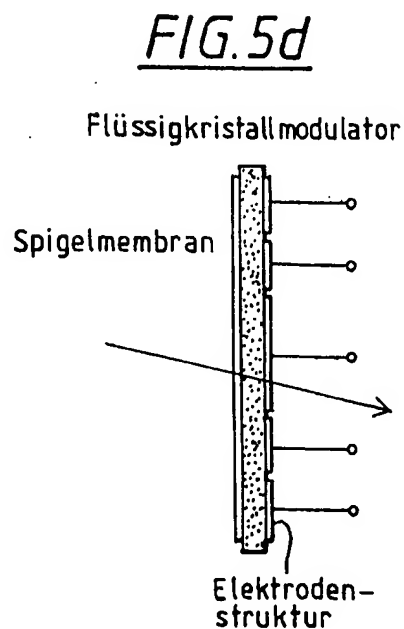
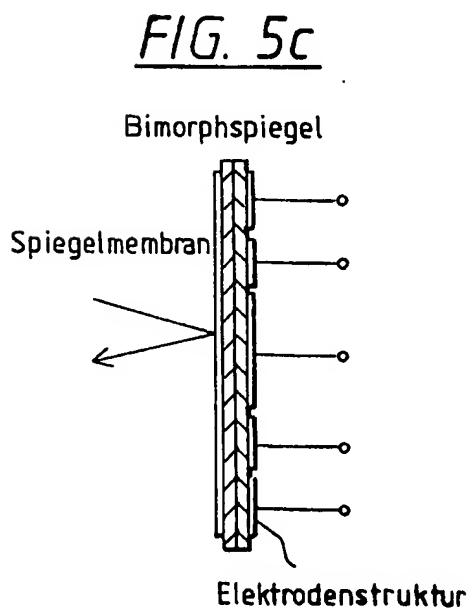
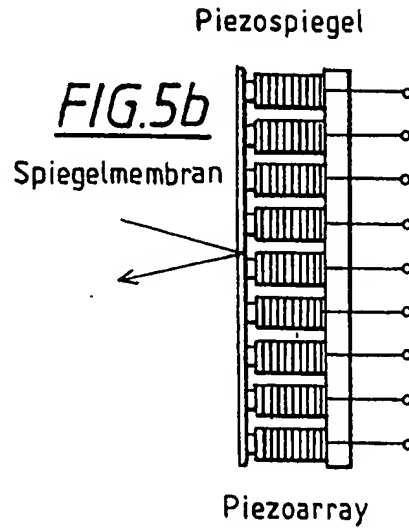
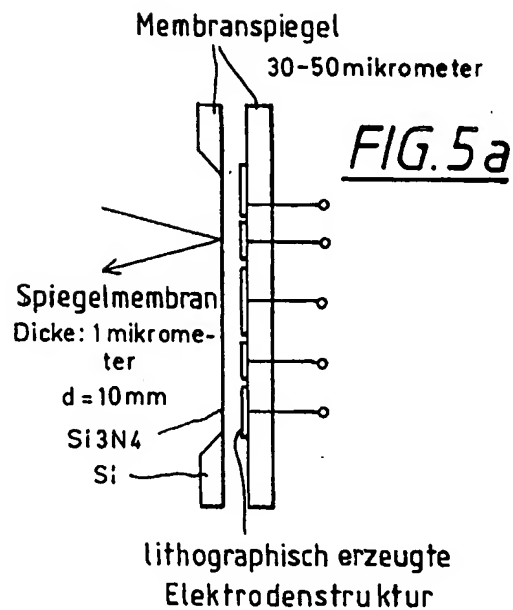
Korrektur von Aberration



Aktuatorstrukturen

FIG. 4a $dr \text{ prop. } 1/r$ FIG. 4b $dr \text{ prop. } 1/r$ FIG. 4c $dr \text{ prop. } 1/r^2$ FIG. 4dAstigmatismus, Koma oder
andere Winkelkorrekturen

Phasenmodulatoren
unterschiedliche Realisierungsformen



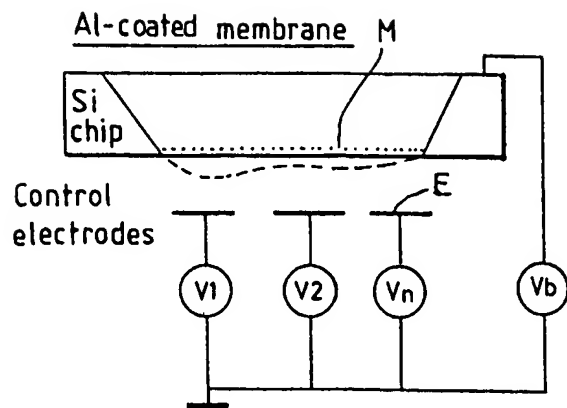
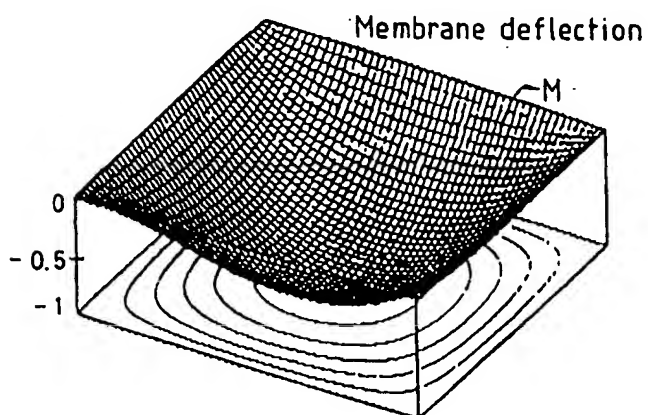
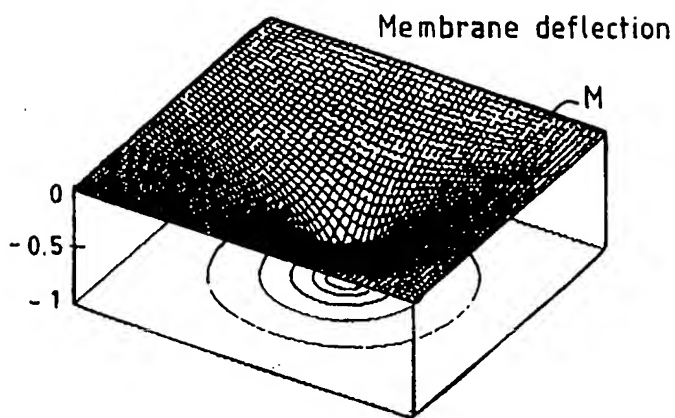
FIG. 6aFIG. 6b

FIG. 8a

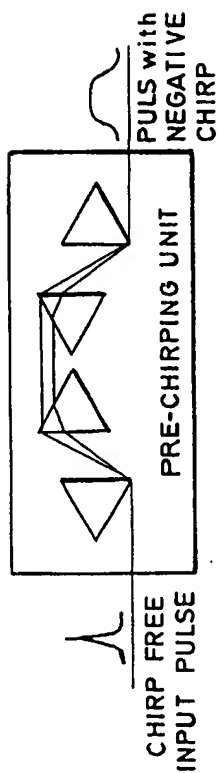


FIG. 8b

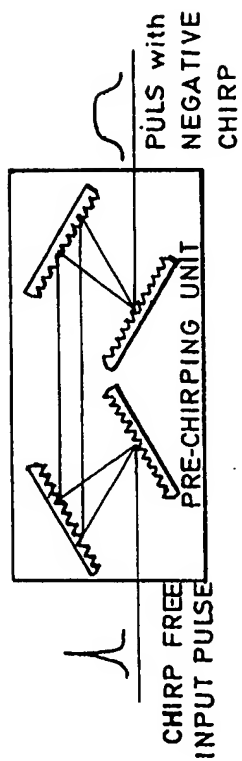
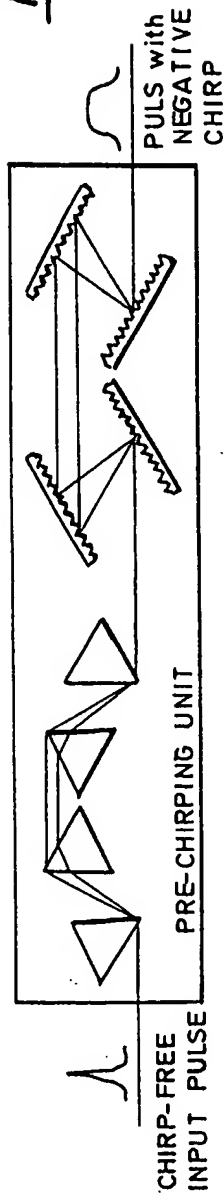







FIG. 8c



MICROSCOPE WITH ADAPTIVE OPTICS SYSTEM


Patent number: WO9906856
Publication date: 1999-02-11
Inventor: FAULSTICH ANDREAS; GRUB ROBERT; GLUCH MARTIN; SIMON ULRICH; VOELCKER MARTIN; WOLLESCHENSKY RALF
Applicant: ZEISS CARL JENA GMBH (DE)
Classification:
 - **International:** G02B
 - **European:** G02B21/24B, G02B26/06
Application number: WO1998EP04801 19980731
Priority number(s): DE19971033193 19970801

Also published as:

 WO9906856 (A3)
 EP0929826 (A3)
 EP0929826 (A2)
 JP11101942 (A)
 DE19733193 (A1)

more >>

Cited documents:

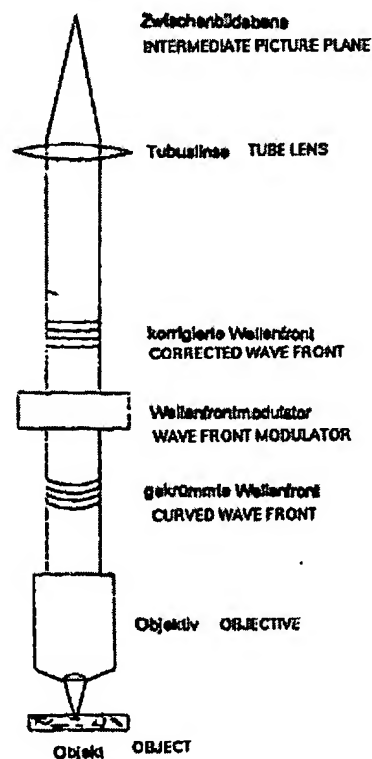
 EP0307354
 WO9322711

Abstract not available for WO9906856
 Abstract of correspondent: **DE19733193**

The invention relates to a microscope with an adaptive optics system in the observation beam, whereby a transmitting wave front modulator is positioned advantageously between the objective and the tube lens or a reflective wave front modulator is connected via beam splitters. The invention also relates to a microscope with an adaptive optics system in the illuminating beam. The invention further relates to a laser scanning microscope comprising at least one adaptive optics system positioned downstream from the laser in the optical beam and advantageously a first adaptive optics system for coarse focusing and a second adaptive optics system for fine focusing, whereby the adaptive optics system can be configured as reflective wave front modulator and the laser as short pulse laser. In addition a combination with a pre-chirp unit can be provided for.

PHASE MODULATOR IN THE OBSERVATION BEAM OF A LIGHT MICROSCOPE:
 Phasenmodulator im Beobachtungs-Strahlengang eines Lichtmikroskops:

Anpassung der Fokussage im Objekt
 ADJUSTMENT OF FOCUSING POSITION IN THE OBJECTIVE



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide